

L'EFFET DE LA COMPLEMENTATION ALIMENTAIRE SUR LE RESISTOME AUX ANTIBIOTIQUES EN POULES PONDEUSES

Corrigan Aoife, Murphy Richard

ALLTECH®, DUNBOYNE, CO. MEATH, IRELAND

acorrigan@alltech.com

RÉSUMÉ

Le microbiome de la volaille est un réservoir potentiel de gènes de résistance aux antibiotiques (ARG). Cette étude a utilisé une approche métagénomique pour analyser le résistome aux antibiotiques dans des échantillons cæcaux de poules pondeuses commerciales nourries avec et sans produit de santé intestinale (Alltech Layer Pack ; ALP). De la 16ème à la 77ème semaine, les poules ont été réparties dans deux poulaillers distincts. Un poulailler a reçu une ration témoin à base de maïs et soja et l'autre poulailler a reçu une ration témoin complétée par ALP (1 kg / To d'aliment). Le séquençage métagénomique a été réalisé sur le contenu caecal de 12 poules pondeuses prélevées au hasard par groupe de traitement à l'âge de 77 semaines à l'aide de la technologie Illumina. Le logiciel Resistance Gene Identifier (RGI) a été utilisé pour aligner les informations d'Unigenes avec la base de données complète sur la résistance aux antibiotiques (CARD).

Au total, 469 gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) ont été détectés et l'analyse de la similarité entre les poules témoins et les poules supplémentées en ALP a montré qu'il y avait des différences significatives dans la composition en ARG entre les groupes ($r = 0,928$; $P = 0,001$). L'abondance relative totale des ARG dans le groupe témoin (0,0712 %) était significativement plus élevée que dans le groupe supplémenté en ALP (0,0539 %). Selon la base de données CARD, les ARG de cette étude ont été classés en 10 catégories principales, en fonction de leur mécanisme de résistance. Sur les 469 ARG détectés, 41 présentaient des différences significatives entre les poules témoins et les poules supplémentées en ALP ($p < 0,05$, $q < 0,05$). 2 ARG étaient supérieurs et les 39 gènes restants plus faibles dans les échantillons supplémentés en ALP.

Ces résultats suggèrent que les stratégies de supplémentation alimentaire peuvent avoir un rôle important à jouer dans la modulation et potentiellement la réduction de la résistance intestinale aux antibiotiques.

ABSTRACT

The effect of dietary supplementation on the antibiotic resistome of laying hens.

As the poultry microbiome is a potential reservoir of antibiotic resistance genes (ARGs), this study used a metagenomics approach to analyse the antibiotic resistome in cecal samples of commercial laying hens fed with and without a gut health product (Alltech Layer Pack; ALP). Commercial laying hens were housed in one of two sheds and fed either a corn-soy based control diet or a control diet supplemented with ALP (1 kg t-1) from week 16 to week 77 of age. Metagenomic sequencing was carried out on the cecal content of 12 randomly sampled layers per treatment group at 77 weeks of age using Illumina technology. The Resistance Gene Identifier (RGI) software was used to align Unigenes information with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD).

In total, 469 antibiotic resistance genes (ARGs) were detected and analysis of similarity between control and ALP supplemented layers showed that there were significant differences in ARG composition between groups ($r = 0.928$, $P = 0.001$). The total relative abundance of ARGs in the control group (0.0712%) was significantly greater when compared to the ALP supplemented group (0.0539%). According to the CARD database, the ARGs in this study were classified into 10 primary categories-based on their resistance mechanism. Of the 469 ARGs detected 41 were significantly different between control and ALP supplemented layers ($p < 0.05$, $q < 0.05$) with 2 ARGs being greater and the remaining 39 genes lower in the ALP supplemented samples.

These findings suggest that dietary supplementation strategies may have an important role to play in modulating and potentially lowering the burden of intestinal antibiotic resistance.

INTRODUCTION

La résistance aux antibiotiques est reconnue comme l'une des principales menaces pour la santé humaine et animale. En raison de l'émergence et de la propagation de bactéries résistantes aux antibiotiques, l'Union Européenne (UE) a interdit l'utilisation d'antibiotiques facteurs de croissance (AGP) dans la production animale en 2006. Les États-Unis et la Chine ont respectivement imposé des restrictions en 2017 et 2020 (Ma et al. 2021). Ces restrictions sur les antibiotiques stimulateurs de croissance ont incité les éleveurs à utiliser des stratégies alternatives de complémentation alimentaire afin d'améliorer les performances animales et optimiser la santé intestinale. Le microbiome de la volaille constitue un important réservoir de résistance aux antibiotiques, pourtant l'impact de la supplémentation alimentaire sur le résistome intestinal aux antibiotiques est un domaine largement sous-exploré. Nous avons par conséquent décidé d'analyser dans cette étude des échantillons de poules pondeuses à l'aide d'une approche métagénomique afin de déterminer le résistome aux antibiotiques de poules pondeuses nourries avec et sans produit de santé intestinale (ALP).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Protocole expérimental

L'essai sur les poules pondeuses a été réalisé sur un site de production commerciale au Royaume-Uni. 8000 poulettes âgées de 16 semaines ont été assignées au hasard à l'un des deux poulaillers d'une unité de production commerciale en plein air où elles ont reçu soit une ration standard maïs-soja sous forme de mash (groupe témoin), soit une ration standard complétement avec le produit de santé intestinale Alltech Layer Pack (ALP) fourni par Alltech® à un taux d'inclusion de 1 kg / to d'aliment (groupe ALP). Les poules ont été élevées selon les conditions de production commerciale habituelles, recevant de la nourriture et de l'eau à volonté, et ont été élevées en liberté jusqu'à l'âge de 50 semaines, puis intégralement en bâtiment jusqu'à la fin de l'essai. Toutes les autres conditions ont été maintenues uniformes entre les groupes. Les oiseaux ont été abattus à la fin de la ponte (77 semaines) et le contenu cæcal de 12 oiseaux sélectionnés au hasard par poulailler a été transféré de manière aseptique dans des tubes stériles contenant 10 ml de solution de stabilisation DNASHield (DNA/RNA Shield, Zymo Research, États-Unis). Les tubes ont été conservés à température ambiante pour l'expédition et réfrigérés par la suite. Les animaux ont été euthanasiés sans

cruauté conformément aux protocoles d'abattage sans cruauté énoncés dans le règlement UE 1099/2009.

1.2. Analyse du résistome

L'ADN a été extrait du contenu cæcal et les banques de séquençage ont été générées à l'aide du kit de préparation de la bibliothèque d'ADN NEBNext® Ultra™ pour le séquençage Illumina. Le séquençage métagénomique a été réalisé à l'aide de la plate-forme Illumina NovaSeq 6000 avec un séquençage en paire avec lecture à 150 pb. Le séquençage et le prétraitement des données brutes ont permis d'obtenir des lectures propres. Le logiciel RGI (Resistance Gene Identifier) a ensuite été utilisé pour aligner Unigenes sur la base de données complète de résistance aux antibiotiques (CARD) afin d'identifier les gènes de résistance aux antibiotiques (ARG).

1.3. Comparaisons statistiques

L'analyse ANOSIM (pack R vegan, version 2.15.3) a été utilisée pour tester les différences entre les groupes. Une analyse Metastats a été utilisée pour effectuer des tests de permutation sur l'abondance des gènes entre les groupes afin d'obtenir des valeurs significatives (valeur p). La méthode de correction FDR de Benjamini et Hochberg a ensuite été utilisée pour corriger la valeur p et obtenir une valeur q où $p \leq 0,05$ a été jugé significatif.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Au total, 469 gènes de résistance aux antibiotiques ont été détectés et l'analyse de similarité (ANOSIM) entre le groupe témoin et le groupe ALP a montré qu'il y avait des différences significatives dans la composition en ARG entre les groupes ($r = 0,928$, $P = 0,001$). Les 20 gènes de résistance aux antibiotiques les plus abondants pour les groupes témoins et ALP sont présentés à la figure 1. L'abondance relative totale des gènes de résistance aux antibiotiques était significativement plus faible dans le groupe ALP (0,05 %) que dans le groupe témoin (0,07 %) ($p \leq 0,05$). Parmi les 469 ARG détectés, 41 présentaient des différences significatives entre le groupe témoin et le groupe ALP ($p < 0,05$, $q < 0,05$) : 2 ARG étaient plus grands et les 39 ARG restants étaient plus faibles dans les échantillons du groupe ALP. Les gènes significativement différents entre les groupes sont présentés dans le tableau 1 et ont été associés aux mécanismes de résistance aux antibiotiques suivants : efflux d'antibiotiques (24 gènes), inactivation d'antibiotiques (6 gènes), altération de la cible antibiotique (5 gènes), protection de la cible antibiotique (4 gènes), altération de la cible antibiotique et efflux d'antibiotiques (2 gènes) et altération de la cible antibiotique, efflux d'antibiotiques, perméabilité réduite à l'antibiotique

(tableau 1). Ces gènes ont été associés à une résistance aux classes d'antibiotiques suivantes : aminocoumarine (2 gènes), aminoside (2 gènes), fluoroquinolone (4 gènes), fosfomycine (2 gènes), macrolide (1 gène), antibiotique peptidique (3 gènes), tétracyclines (8 gènes) ou multirésistants (19 gènes). Les associations phylogénétiques de plusieurs de ces gènes de résistance aux antibiotiques ont été attribuées à l'embranchement des protéobactéries et à la famille des entérobactéries. Bien que toutes les entérobactéries ne soient pas source de maladie, de nombreuses bactéries pathogènes, y compris celles qui sont pertinentes pour les volailles, telles que *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* et d'autres espèces sont des entérobactéries (Wigley, 2015, Nhung et al., 2017). La réduction de la prévalence des gènes de résistance

associés aux entérobactéries peut être bénéfique pour limiter la propagation de la résistance aux antibiotiques.

CONCLUSION

Les résultats suggèrent que la supplémentation en ALP a eu un impact sur les gènes de résistance aux antimicrobiens dans le contenu caecal des poules pondeuses. Des recherches futures pourraient étudier les voies spécifiques par lesquelles les composants alimentaires peuvent influencer les communautés microbiennes et la résistance aux antibiotiques. Ces résultats contribuent à accroître les connaissances sur les effets multiples de l'alimentation des poules pondeuses sur la santé intestinale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ma, Feiyang, Shixin Xu, Zhaoxin Tang, Zekun Li, and Lu Zhang. 2021. Biosafe. Health 3 (1):32-38.
Wigley, P. 2015. Front Vet Sci 2:40.
Nhung, N. T., Chansiripornchai and J. J. Carrique-Mas. 2017. Front Vet Sci 4:126

Tableau 1. Gènes de résistance aux antibiotiques significativement différents entre le groupe contrôle et le groupe ALP

Gene	Drug_Class	Resistance Mechanism	Phylogenetic association	Control (%)	MRF (%)	p value	q value
mdtB	aminocoumarin antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria;Enterobacteriaceae	9.06E-07	1.21E-07	0.001	0.009
mdtC	aminocoumarin antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria;Enterobacteriaceae	1.32E-06	2.84E-07	0.005	0.032
APH3_IVa	aminoglycoside antibiotic	antibiotic inactivation		0.00E+00	6.40E-08	0.001	0.009
kdpE	aminoglycoside antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria	8.52E-07	8.74E-08	0.002	0.015
baeS	aminoglycoside antibiotic; aminocoumarin antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria	7.56E-07	8.62E-08	0.001	0.009
ampC	cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	Proteobacteria;Enterobacteriaceae	9.61E-07	1.61E-07	0.003	0.020
OXA_136	cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	Spirochaetes;Brachyspira pilosicoli	7.55E-07	0.00E+00	0.001	0.009
OXA_244	cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	Unknown	1.58E-07	0.00E+00	0.001	0.009
OXA_7	cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	Bacteroidetes;Bacteroides	4.71E-07	1.03E-06	0.008	0.046
patA	fluoroquinolone antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria/Firmicutes	9.10E-07	1.74E-07	0.003	0.020
emrA	fluoroquinolone antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria	8.90E-07	8.90E-08	0.001	0.009
mdtH	fluoroquinolone antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria	7.05E-07	8.90E-08	0.007	0.042
pmrA	fluoroquinolone antibiotic	antibiotic efflux	Bacteroidetes;Bacteroides	1.02E-05	4.33E-06	0.003	0.020
AcrF	fluoroquinolone antibiotic; cephalosporin; cephamycin; penam	antibiotic efflux	Proteobacteria;Enterobacteriaceae	1.63E-06	3.82E-07	0.001	0.009
soxR	fluoroquinolone antibiotic; cephalosporin; glycylicycline; penam; tetracycline antibiotic; rifamycin antibiotic; phenicol antibiotic; triclosan	antibiotic target alteration; antibiotic efflux		1.07E-06	5.37E-08	0.001	0.009
acrB	fluoroquinolone antibiotic; cephalosporin; glycylicycline; penam; tetracycline antibiotic; rifamycin antibiotic; phenicol antibiotic; triclosan	antibiotic efflux	Proteobacteria	8.20E-07	1.02E-07	0.001	0.009
marR	fluoroquinolone antibiotic; cephalosporin; glycylicycline; penam; tetracycline antibiotic; rifamycin antibiotic; phenicol antibiotic; triclosan	antibiotic target alteration; antibiotic efflux	Proteobacteria;Enterobacteriaceae	8.34E-07	7.18E-08	0.004	0.026
soxS	fluoroquinolone antibiotic; monobactam; carbapenem; cephalosporin; glycylicycline; cephamycin; penam; tetracycline antibiotic; rifamycin antibiotic; phenicol antibiotic; triclosan; penem	antibiotic target alteration; antibiotic efflux	Bacteria	1.16E-06	1.33E-07	0.002	0.015
GlpT	fosfomycin	antibiotic target alteration	Bacteria	8.14E-07	1.36E-07	0.002	0.015
mdtG	fosfomycin	antibiotic efflux	Proteobacteria	1.05E-06	1.90E-07	0.001	0.009
mefC	macrolide antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria;Enterobacteriaceae	2.19E-06	2.16E-07	0.001	0.009
H_NS	macrolide antibiotic; fluoroquinolone antibiotic; cephalosporin; cephamycin; penam; tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	Bacteroidetes;Bacteroides coprophilus	6.65E-07	7.67E-08	0.001	0.009
mdtE	macrolide antibiotic; fluoroquinolone antibiotic; penam	antibiotic efflux	Proteobacteria	9.49E-07	1.39E-07	0.002	0.015
evgS	macrolide antibiotic; fluoroquinolone antibiotic; penam; tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria	5.90E-07	7.55E-08	0.001	0.009
RlmAll	macrolide antibiotic; lincosamide antibiotic	antibiotic target alteration	Proteobacteria;Enterobacteriaceae	1.77E-07	7.68E-07	0.001	0.009
PBP3	monobactam; carbapenem; cephalosporin; cephamycin; penam	antibiotic target alteration	Bacteroidetes;Prevotella bryantii	1.02E-06	1.27E-07	0.003	0.020
mdtN	nucleoside antibiotic; acridine dye	antibiotic efflux	Proteobacteria	8.21E-07	1.59E-07	0.006	0.037
YojI	peptide antibiotic	antibiotic efflux	Bacteria	7.57E-07	8.96E-08	0.001	0.009
PmrF	peptide antibiotic	antibiotic target alteration	Proteobacteria	1.13E-06	2.07E-07	0.002	0.015
baeA	peptide antibiotic	antibiotic target alteration	Proteobacteria	7.34E-07	1.26E-07	0.003	0.020
vgaC	streptogramin antibiotic; pleuromutilin antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria;Enterobacteriaceae	8.45E-07	0.00E+00	0.001	0.009
emrK	tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	Proteobacteria	5.73E-07	9.31E-08	0.001	0.009
tet40	tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	Firmicutes;Clostridiales	1.00E-05	3.71E-06	0.001	0.009
tetK	tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	Bacteroidetes;Bacteroides	7.68E-06	2.25E-06	0.001	0.009
tetL	tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	Bacteria	3.40E-06	8.65E-07	0.003	0.020
tet44	tetracycline antibiotic	antibiotic target protection	Bacteroidetes;Bacteroides	8.11E-05	3.34E-05	0.001	0.009
tetBP	tetracycline antibiotic	antibiotic target protection	Bacteria	1.70E-06	6.73E-07	0.007	0.042
tetO	tetracycline antibiotic	antibiotic target protection	Bacteria	1.88E-05	8.25E-06	0.001	0.009
tetW/N/W	tetracycline antibiotic	antibiotic target protection	Bacteria	2.26E-04	1.57E-04	0.001	0.009
mdfA	tetracycline antibiotic; benzalkonium chloride; rhodamine	antibiotic efflux	Bacteria	5.75E-07	8.33E-08	0.001	0.009
emrD		antibiotic efflux	Escherichia coli	9.01E-07	1.19E-07	0.001	0.009

Figure 1. Abondance relative (ppm) des 20 principaux gènes de résistance aux antibiotiques dans les groupes témoin et ALP. Significativement moins de gènes de résistance aux antibiotiques ont été détectés dans les échantillons caecal du groupe ALP.

